

40/52/438
P/KR 03/01820
RO/KR 04.09.2003

Rec'd 11 MAR 2005

REC'D 29 SEP 2003

WIPO

PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0055575
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 09월 13일
Date of Application SEP 13, 2002

출원인 : 한국생명공학연구원
Applicant(s) Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnol

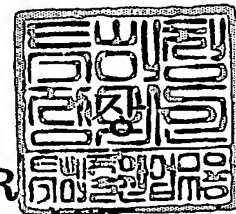
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 09 월 04 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.09.13
【발명의 명칭】	효모 표면 발현 벡터를 이용하여 변이 리파제를 스크리닝하는 방법 및 신규 변이 리파제
【발명의 영문명칭】	Method for screening of a lipase having improved enzymatic activity using yeast surface display vector and the lipas
【출원인】	
【명칭】	한국생명공학연구원
【출원인코드】	3-1999-034166-5
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	2002-029927-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	최의성
【성명의 영문표기】	CHOI, Eui-Sung
【주민등록번호】	540923-1037424
【우편번호】	305-335
【주소】	대전광역시 유성구 궁동 395-3 다솔아파트 102동 507호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	손정훈
【성명의 영문표기】	SOHN, Jung-Hoon
【주민등록번호】	610728-1674115
【우편번호】	302-280
【주소】	대전광역시 서구 월평동 누리아파트 103동 506호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김소영
【성명의 영문표기】	KIM, So-Young
【주민등록번호】	720617-2067224

【우편번호】	427-010
【주소】	경기도 과천시 중앙동 주공아파트 1005동 503호
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국생명공학연구소 유전자은행
【수탁번호】	KCTC 10320BP
【수탁일자】	2002.07.31
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국생명공학연구소 유전자은행
【수탁번호】	KCTC 10321BP
【수탁일자】	2002.07.31
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	18
【서열목록의 전자파일】	첨부
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의 한 출원심사 를 청구합니다. 대리인 이원희 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	20 면 29,000 원
【가산출원료】	40 면 40,000 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	33 항 1,165,000 원
【합계】	1,234,000 원
【감면사유】	정부출연연구기관
【감면후 수수료】	617,000 원
【첨부서류】	1: 요약서·명세서(도면)_1통 2.미생물기탁증명서_2통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 효모 표면 발현백터를 이용하여 변이 리파제를 스크리닝하는 방법 및 그 제조 산물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 1) 리파제의 유전자를 표면 발현 벡터에 클로닝하는 단계; 2) 상기 단계 1의 발현 벡터의 리파제 유전자를 주형으로 변이 유도 PCR을 수행하여 변이 유전자를 제조하는 단계; 3) 상기 단계 2를 통해 증폭된 변이 유전자를 표면 발현 벡터와 함께 숙주세포에 형질전환시키는 단계; 및 4) 상기 단계 3의 형질전환체 표면에 발현된 변이 리파제의 활성을 측정하여 활성이 뛰어난 변이 리파제를 스크리닝하는 단계를 포함하는 변이 리파제 스크리닝 방법 및 그 산물에 관한 것이다. 본 발명의 변이 리파제 스크리닝 방법은 높은 활성의 변이 리파제를 생산하는 형질전환체를 용이하게 제조할 수 있으며, 상기 형질전환체에서 제조된 변이 리파제는 형질전환된 세포의 표면에 고정화되어 회수가 용이하고, 재생산이 가능할 뿐만 아니라 대량 생산이 가능하므로, 식품 산업, 미세 화합물 합성 및 계면 활성제 사업 등에 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 1

【명세서】

【발명의 명칭】

면 발현 벡터를 이용하여 변이 리파제를 스크리닝하는 방법 및 신규 변이 리파제
 screening of a lipase having improved enzymatic activity using yeast surface
 or and the lipase}

【단순한 설명】

도 1은 CALB 분비 벡터(pGK-Lip*)와 CALB 표면 발현 벡터(pGK-Lip-CwpF)를 나타낸 그림

다.

pGPD : GAPDH 프로모터,

KT : 킬러톡신 분비신호서열,

tUK : 알려지지 않은 터미네이터(Kang *et al.*, *Yeast*, 1998, 14, 371),

c : HARS36의 유전체 말단 부위,

BD : 벤트(bent) DNA 도메인,

ARS : HARS36의 자기복제서열 및

Rep : HARS36의 텔로머릭 반복서열 (Sohn *et al.*, *J. Bacteriol.*, 1996, 178, 4420).

도 2는 CALB 변이주 Lip10 및 Lip14의 아미노산을 야생형(Lip wt)과 비교한 도면이다.

도 3은 CALB 변이주의 활성 부위 구조를 야생성과 비교하여 나타낸 그림이다.

A : 야생형 리파제의 활성 부위 구조이고,

B : 변이 리파제의 활성 부위 구조이다.

도 4는 변이 CALB의 활성을 평판 배지상에서 확인한 그림이다.

레인 1 : Wt; 야생형 한세놀라 폴리 모프파 DL1 균주,

레인 2 : Lip-CwpF; 리파제를 표면에 발현하는 벡터(pLGK-Lip-CwpF)를 포함하는 균주,

레인 3 및 4 : Lip10-CwpF 및 Lip14-CwpF; Lip10 및 Lip14의 표면 발현 벡터
(pLGK-Lip-CwpF)를 포함한 균주,

레인 5 : Lip*; 리파제의 분비형 벡터(pLGK-Lip*)를 함유한 균주 및

레인 6 및 7 : Lip10 및 Lip14; 변이 리파제 Lip10 및 Lip14의 분비형 벡터(pLGK-Lip*)
를 함유한 균주.

도 5는 CALB 발현 변이주의 배양 상등액을 전기영동한 사진이다.

레인 1 : Lipwt* 균주,

레인 2 : Lip10* 균주,

레인 3 : Lip14* 균주,

레인 4 및 5 : LP 변이주,

레인 6 및 7 : LQ 변이주 및

레인 8 및 9 : LPQ 변이주.

도 6a은 한세놀라 폴리모르파 DL1 균주의 배양 온도 변화에 따른 CALB의 리파제 활성을
비교한 그래프이다.

도 6b는 한세놀라 폴리모르파 A16 균주의 배양 온도 변화에 따른 CALB의 리파제 활성을
비교한 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<28> 본 발명은 효모 표면 발현백터를 이용하여 변이 리파제를 스크리닝하는 방법 및 그 산물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 1) 리파제의 유전자를 표면 발현 벡터에 클로닝하는 단계; 2) 상기 단계 1의 발현 벡터의 리파제 유전자를 주형으로 변이 유도 PCR을 수행하여 변이 유전자를 제조하는 단계; 3) 상기 단계 2를 통해 증폭된 변이 유전자를 표면 발현 벡터와 함께 숙주세포에 형질전환시키는 단계; 및 4) 상기 단계 3의 형질전환체 표면에 발현된 변이 리파제의 활성을 측정하여 활성이 뛰어난 변이 리파제를 스크리닝하는 단계를 포함하는 변이 리파제 스크리닝 방법 및 그 산물에 관한 것이다.

<29> 리파제(lipase)는 카르복실릭 에스터 수산화효소(carboxylic ester hydrolase)로 식품 산업, 미세화합물 합성, 계면 활성제 사업 등에 많이 이용되는 효소이다. 많은 미생물 유래의 리파제 중 캔디다 안타크티카(*Candida antarctica*) 유래의 리파제 B는(이하 'CALB'라 약칭한다) 317개의 아미노산으로 구성되어 있으며 α/β 수산화 효소의 형태를 가진다.

<30> CALB는 광학이성질체의 선별 및 폴리에스터 합성(Anderson *et al.*, *Biocatal. Biotransform.*, 1998, 16, 181)에서 산업적으로 중요성을 가지며, CALB는 2가 알콜(sec-alcohol) 및 2가 아민을 특이적으로 광학 전환할 수 있어(Rotticci *et al.*, *Chembiochem.*, 2001, 2, 766) 의약품 및 농약 등의 제조에 다양하게 이용된다.

<31> 최근 몇 년간 새로운 백신의 생산, 각종 항원과 항체의 스크리닝, 유용한 효소의 세포 표면으로의 고정화 등의 목적으로 박테리오파지를 포함한 세균과 효모 등의 단세포 생물의 세포 표면에 외래단백질을 발현시키는 연구가 활발히 진행되어 널리 이용되고 있다. 효모인 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)를 이용한 단백질의 세포 표면 발현에 관한 연구가 지속적으로 진행되고 있는데, 효모는 고등 진핵세포와 세포내 분비시스템을 이용하여 외래 단백질을 활성이 있는 형태로 배지로 분비시킬 수 있어, 유전자 재조합 기술을 이용해 유용한 외래 단백질을 생산하기 위한 숙주로서의 이용성이 증대되고 있다. 효모의 표면 발현을 위해서 대표적 세포벽 단백질인 α -어글루티닌(α -agglutinin)에 관한 연구(Schreuder *et al.*, *Yeast.*, 1993, 9, 399)가 수행되었으며, α -어글루티닌 또는 기타의 세포벽 단백질을 이용하여 β -갈락토시다이스(β -galactosidase), 글루코아밀레이즈(glucoamylase), 리파제(lipase), 큐티네이스(cutinase)등의 다양한 효소가 세포의 표면에 안정적으로 발현되었다.

<32> 또한, 여러 효소를 한 세포 내에 동시에 발현함으로써 산업적으로 유용한 생촉매(biocatalyst)의 개발이 가능한 것으로 보고된 바 있다(Murai *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 51, 65). 식품이나 의약품 소재의 생물전환을 위한 미생물유래의 생물촉매는 현재까지 세포 내에서 발현된 효소를 세포 파쇄하고 분리하여 담체에 고정화한 후 사용하거나 틀루엔등과 같은 침투성 용매를 처리하여 사용해 왔는데, 상기의 방법은 공정상의 비용이 많이 들고 사용 중 효소가 불활성화되는 문제가 있어 공정 전체의 생산성이 저하되는 문제가 있었다.

<33> 최근 사카로마이세스 세레비시아를 이용한 표면 발현을 이용하여 원하는 단백질을 발현하는 세포를 선별하는 방법에 관하여 많은 연구가 이루어지고 있는데, 효모는 진핵세포로서 고

등동물과 유사한 단백질의 공정 과정을 가지고 있으며, 크기가 커서 유세포분석기(FACS) 등에 의해 세포의 선별이 가능하며, 미세한 차이를 보이는 세포를 서로 구별해내는 것이 가능하다는 장점이 있다(VanAntwerp and Wittrup., *Biotechnol. Prog.*, 2000, 16, 31). 또한, 표면 발현 효모를 이용하여 라이브러리를 구축하고 세포를 선별할 경우, 유전자 조작이 용이하여 쉽게 라이브러리를 구축할 수 있으며, 발현량의 차이가 나는 점을 극복할 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한, 표면 발현을 통하여 활성이 증가된 효소를 선별한 경우 표면 발현에 가장 적합한 효소를 선별하게 됨으로서 표면발현 효소의 이용가능성을 더욱 증대시킬 수 있다. 현재까지 효모의 표면에 항체 및 항원, T 세포 수용체 등을 발현하여 친화도가 증진된 균주를 유세포분석기를 이용하여 선별한 경우는 많이 있으나(Schreuder *et al.*, *Vaccine.*, 1996, 14, 383, Kieke *et al.*, *Protein. Eng.*, 1997, 10, 1303, Kieke *et al.*, 1999, 96, 5651), 아직까지 효소의 활성을 선별한 예는 보고된 바 없고, 단지 대장균에서 슈도모나스(*Pseudomonas* sp.) 유래의 병핵 활성 단백질을 매개체로 이용한 표면 발현으로 활성이 증진된 카르복시메틸 셀룰레이즈(carboxymethyl cellulase)를 선별한 예만이 보고된 바 있다(Kim *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66, 788).

<34> 본 발명자들은 이전에 산업적으로 유용하게 사용되던 메탄올 자화 효모의 일종인 한세놀라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha*) 균주를 대상으로 신규한 세포벽 부착 매개 단백질을 분리하고 이를 이용하여 목표 단백질을 세포 표면에 발현시키는 신규한 표면 발현 시스템을 개발하였다(PCT/KR00/00819). 상기 한세놀라 폴리모르파는 강력한 프로모터를 가진 산업용 균주로서 외래 단백질 생산이 매우 뛰어나며, 균주의 생육이 빠르고 고온 및 유기 용매에서의 안정성을 가지고 있어 리파제 등의 효소 생산 및 생물 반응계에 매우 적합한 균주이다.

<35> 이에, 본 발명자들은 산업적으로 유용하게 사용되는 생물 촉매인 리파제를 대량으로 생산하기 위해, 목표 단백질을 세포 표면에 발현시키는 표면 발현 시스템(PCT/KR00/00819)을 이용하여 캔디다 안타크티카(*Candida antarctica*) 리파제 B의 변이 라이브러리를 제조하고, 상기 변이주 중에서 리파제 활성이 매우 우수한 변이주를 선별하였으며, 상기 변이주로부터 변이 리파제 단백질을 대량 생산하는 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<36> 본 발명의 목적은 효모 표면 발현 벡터를 이용하여 변이 리파제를 스크리닝하는 방법, 상기 방법을 이용하여 획득한 리파제의 변이 단백질, 이를 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현 벡터가 도입된 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용해 변이 리파제를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<37> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 1) 리파제의 유전자를 표면 발현 벡터에 클로닝하는 단계; 2) 상기 단계 1의 발현 벡터의 리파제 유전자를 주형으로 변이 유도 PCR을 수행하여 변이 리파제 유전자를 제조하는 단계; 3) 상기 단계 2를 통해 증폭된 변이 유전자를 표면 발현 벡터와 함께 숙주세포에 형질전환시키는 단계; 및 4) 상기 단계 3의 형질전환체 표면에 발현된 변이 리파제의 활성을 측정하여 활성이 뛰어난 변이 리파제를 스크리닝하는 단계를 포함하는 변이 리파제 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명은 상기 스크리닝 방법에 의해 획득한 서열번호 14로 기재되는 캔디다 엔타크티 리파제 B의 219번 루이신 및/또는 278번 루이신이 다른 아미노산으로 치환된 것을 특변이 리파제 단백질을 제공한다.

본 발명은 상기 변이 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

본 발명은 상기의 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

본 발명은 상기 발현 벡터를 숙주세포에 도입한 형질전환체를 제공한다.

본 발명은 상기 형질전환체를 배양하여 변이 리파제 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<44> 본 발명은

<45> 1) 리파제의 유전자를 표면 발현 벡터에 클로닝하는 단계;

<46> 2) 상기 단계 1의 발현 벡터의 리파제 유전자를 주형으로 변이 유도 PCR을 수행하여 변이 유전자를 제조하는 단계;

<47> 3) 상기 단계 2를 통해 증폭된 변이 유전자를 표면 발현 벡터와 함께 숙주세포에 형질전환시키는 단계; 및

<48> 4) 상기 단계 3의 형질전환체 표면에 발현된 변이 리파제의 활성을 측정하여 활성이 뛰어난 변이 리파제를 스크리닝하는 단계를 포함하는 변이 리파제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

- <49> 본 발명에서 상기 '표면 발현 벡터'라 함은 세포의 표면에 외래 단백질을 안정적으로 발현시키는 벡터를 의미한다.
- <50> 본 발명에서 표면 발현 벡터에 클로닝 하기 위해 사용한 리파제는 캔디다 안타크티카(*Candida antarctica*)에서 유래한 서열번호 14로 기재되는 캔디다 안타크티카 리파제 B(*Candida antarctica* lipase B)를 사용하는 것이 바람직하다.
- <51> 본 발명의 스크리닝 방법에서 상기 표면 발현 벡터는 형질전환체의 표면에 외래 단백질을 발현시킬 수 있는 벡터로서, 프로모터 유전자, 분비신호서열을 코딩하는 유전자, 리파제 유전자 또는 변이 리파제 유전자, 표면 발현 매개 유전자 및 터미네이터 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <52> 상기 표면 발현 벡터의 프로모터 유전자는 GAPDH, PGK, ADH, PHO5, GAL1, GAL10, SED1, MOX, TEF 및 TPI로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자인 것이 바람직하고, 상기 분비신호서열을 코딩하는 유전자는 MF α , PHO5, SUC2, AMY, SED 및 킬리톡신으로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자인 것이 바람직하며, 상기 표면 발현 매개 유전자는 리파제를 세포표면에 발현하게 하는 인자로, 세포벽을 구성하는 유전자인 SED1, PIR2, TIP1, CWP1, GAS1 및 WSC1로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자인 것이 바람직하며 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- <53> 본 발명의 스크리닝 방법에서 상기 단계 3에서 형질전환시키기 위해 사용한 숙주세포는 캔디다(*Candida*), 디베리오마이세스(*Debaryomyces*), 한세놀라(*Hansenula*), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*), 피키아(*Pichia*), 스키향사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*), 야로이아(*Yarrowia*) 및 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 속 등의 효모류, 아스퍼질러스(*Aspergillus*), 페니실리엄(*Penicillium*) 및 라이조피스(*Rhizopus*) 속 등의 사상 균류 또는 에شري키아(*Escherichia*)

Escherichia) 및 바실러스(*Bacillus*) 속 등의 세균류를 사용할 수 있으나 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

- <54> 본 발명의 상세한 설명에서는 구체적으로, 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁된 수탁번호 KCTC 0824BP, KCTC 0825BP, KCTC 0826BP, KCTC 0827BP 및 KCTC 0828BP 형질전환체에 도입된 표면 발현백터를 사용하였다(특허출원 2000-42939).
- <55> 본 발명의 스크리닝 방법으로 리파제 유전자를 표면 발현백터에 클로닝하고 변이유도 PCR을 수행하여 리파제 유전자 변이를 유도한 후 숙주세포에 형질전환시켜 발현시키면, 상기 변이 리파제가 형질전환체의 표면에 위치한다. 이와 같이 형질전환체 표면에 발현된 변이 리파제의 활성을 측정하면 고효율의 변이 리파제를 신속하고 간편하게 스크리닝할 수 있다.
- <56> 또한, 본 발명은 상기 스크리닝 방법에 의해 획득한 서열번호 14로 기재되는 캔디다 엔타크티카 리파제 B의 219번 루이신 및/또는 278번 루이신이 다른 아미노산으로 치환된 것을 특징으로 하는 변이 리파제 단백질을 제공한다.
- <57> 본 발명은 서열번호 14로 기재되는 캔디다 엔타크티카(*Candida antarctica*) 리파제 B(이하, "CALB"라 약칭한다)의 219번 아미노산 및/또는 278번 아미노산이 치환된 변이 단백질을 제공한다.
- <58> 본 발명의 변이 단백질은 서열번호 14로 기재되는 CALB의 219번 아미노산인 소수성 아미노산 루이신을 글루타민, 히스티딘, 아르기닌, 리신, 세린, 트레오닌, 아스파라긴산 및 글루탐산로 이루어진 군으로부터 선택되는 친수성 아미노산으로 치환시킨 것이 바람직하고, 루이신을 글루타민으로 치환시킨 서열번호 11로 기재되는 것이 더욱 바람직하다.

- <59> 또한, 본 발명의 변이 단백질은 서열번호 14로 기재되는 CALB의 278번 아미노산인 루이신을 프롤린, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환시킨 것이 바람직하고, 루이신을 글루타민으로 치환시킨 서열번호 9로 기재되는 것이 더욱 바람직하다.
- <60> 또한, 본 발명의 변이 단백질은 서열번호 14로 기재되는 CALB의 219번 아미노산인 루이신을 글루타민, 히스티딘, 아르기닌, 리신, 세린, 트레오닌, 아스파라긴산 및 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 친수성 아미노산으로 치환시키고, 278번 아미노산인 루이신을 프롤린, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환시킨 것이 바람직하고, 루이신을 글루타민으로 치환시키고, 278번 루이신을 프롤린으로 치환시킨 서열번호 10으로 기재되는 것이 더욱 바람직하다.
- <61> CALB의 219번째 루이신은 표면으로 노출되어 있는 아미노산으로 소수성을 가지는데 상기 루이신이 친수성 아미노산으로 치환되면 물에서의 안정성이 높아지므로, 변이 단백질의 효소 활성이 증가될 것이다. 또한, CALB의 278번 아미노산인 루이신은 CALB의 10번째 α 헬릭스에 존재하는데 이 부위는 리파제 활성 부위의 뚜껑 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다(Uppenberget *et al.*, *Structure.*, 1994, 2, 293). 10번 α 헬릭스에는 다수의 소수성 아미노산이 포함되어 있는데 이곳의 루이신이 프롤린으로 치환되면 아미노산의 헬릭스 구조를 보다 안정화하고 다른 방향으로의 꺾임 구조를 생성할 수 있으며, 이로 인해 활성부위의 노출 정도를 변화시켜 활성이 증가될 것이다. 또한 278번 루이신은 활성 부위의 표면에 존재하는 전하를 띤 223번의 아스파라긴산과 188번의 글루탐산과 인접한 위치에 존재하는데 상기의 루이신이 프롤린으로 치환된 경우 소수성 말단이 차지하는 공간이 줄어들어 활성부위의 공간이 넓어져 그 공간에 물분자

가 끼어 들 수 있는 구조가 형성되어 이 물 분자에 의해 기질이 안정적으로 활성 부위에 존재할 수 있게 하여 활성이 증가될 것이다.

<62> 리파제 변이 단백질을 생산하는 형질전환체의 세포 배양 상등액으로 효소의 활성을 측정하여 비교한 결과, 서열번호 9, 서열번호 10 및 서열번호 11로 기재되는 아미노산 서열을 가진 변이 단백질은 기질에 대한 친화도는 동일하나, 야생형 CALB에 비해 각각 5배, 10배 및 3배의 효소 활성을 나타내었다(표 3 참조).

<63> 또한 본 발명의 리파제 변이 단백질을 표면에 발현하는 형질전환체의 전세포 분획으로 효소의 활성을 측정하여 비교한 결과, 서열번호 9 및 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열을 가진 변이 단백질은 야생형 CALB에 비해 모두 5배의 활성이 증가하였다(표 1 참조).

<64> 따라서, 본 발명의 리파제 변이 단백질은 정상적인 리파제에 비하여 높은 효소 활성을 가진다.

<65> 또한, 본 발명은 상기 리파제 변이 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

<66> 본 발명의 유전자는 CALB의 219번 아미노산을 글루타민, 히스티딘, 아르기닌, 리신, 세린, 트레오닌, 아스파라긴산 및 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 친수성 아미노산으로 치환시킨 변이 단백질을 코딩하는 유전자인 것이 바람직하고, 서열번호 8로 기재되는 것이 더욱 바람직하다.

- <67> 또한, 본 발명의 유전자는 CALB의 278번 아미노산을 프롤린, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환시킨 변이 단백질을 코딩하는 유전자인 것이 바람직하고, 서열번호 6으로 기재되는 것이 더욱 바람직하다.
- <68> 또한, 본 발명의 유전자는 CALB의 219번 아미노산을 글루타민, 글루타민, 히스티딘, 아르기닌, 리신, 세린, 트레오닌, 아스파라긴산 및 글루탐산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 친수성 아미노산으로 치환시키고, 278번 아미노산을 프롤린, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환시킨 변이 단백질을 코딩하는 유전자인 것이 바람직하고, 서열번호 7로 기재되는 것이 더욱 바람직하다.
- <69> 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- <70> 본 발명의 발현 벡터는 본 발명의 리파제 변이 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하며, 리파제 변이 단백질을 세포 표면에 발현시키는 벡터로 제조할 수 있다.
- <71> 본 발명의 리파제 변이 단백질을 세포 표면에 발현시키는 벡터는, 프로모터 유전자, 분비신호서열을 코딩하는 유전자, 변이 리파제 유전자, 표면 발현 매개 유전자 및 터미네이터 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <72> 상기 표면 발현 벡터의 프로모터 유전자는 GAPDH, PGK, ADH, PHO5, GAL1, GAL10, SED1, MOX, TEF 및 TPI로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자인 것이 바람직하고, 상기 분비신호서열을 코딩하는 유전자는 MF α , PHO5, SUC2, AMY, SED 및 킬리톡신으로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자인 것이 바람직하며, 상기 표면 발현 매개 유전자는 리파제를 세포표면에 발현하게

세포벽을 구성하는 유전자인 SED1, PIR2, TIP1, CWP1, GAS1 및 WSC1로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자인 것이 바람직하며 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 바람직한 실시예에서는 본 발명의 변이 단백질을 코딩하는 유전자인 서열번호 7 또는 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 발현벡터를 제조하였다.

본 발명은 상기 표면 발현 벡터를 숙주세포에 도입시킨 형질전환체를 제공한다.

본 발명의 형질전환체는 상기 리파제 변이 유전자를 포함하는 상기 발현 벡터를 숙주세포에 도입한 것으로, 본 발명에서 사용되는 숙주세포로는 캔디다(*Candida*), 데리도마이세스(*Debaryomyces*), 한세눌라(*Hansenula*), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*), 피치아(*Pichia*), 스킴조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*), 야로이아(*Yarrowia*) 및 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 속 등의 효모류, 아스퍼질러스(*Aspergillus*), 페니실리엄(*Penicillium*) 및 라이조퍼스(*Rhizopus*) 속 등의 사상 균류 및 에서리키아(*Escherichia*), 바실러스(*Bacillus*) 속 등의 세균류를 사용할 수 있고, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

<76> 본 발명의 바람직한 실시예에서는 숙주세포로 효모를 사용하였는데 구체적으로는 한세눌라 폴리모르파 DL1-L, 한세눌라 폴리모르파 A16 또는 사카로마이세스 세레비시애 Y2805를 숙주세포로 사용하여 형질전환체를 제조하였다. 본 발명에서는 서열번호 6 및 서열번호 7로 기재되는 리파제 유전자를 각각 포함하는 발현벡터로 한세눌라 폴리모르파 DL-1을 형질전환시킨 형질전환체를 제조하고, 상기 형질전환체를 한세눌라 폴리모르파/pLGK Lip10 및 한세눌라 폴리모르파/pLGK Lip14라 명명하고, 이를 2002년 7월 31일자로 한국생명공학연구원 유전자 은행에 기탁하였다(수탁번호: KCTC 10320BP 및 KCTC 10321BP).

<77> 또한, 본 발명은 상기 형질전환체를 배양하여 변이 리파제 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

<78> 본 발명의 형질전환체는 숙주세포의 배양 적온에 비하여 5℃ 내지 20℃ 더 낮은 온도에서 배양하여 단백질을 생산하는 것이 바람직하다.

<79> 상기 형질전환체가 한세놀라인 경우 25℃ 내지 30℃인 것이 바람직하고, 사카로마이세스의 경우 20℃ 내지 25℃인 것이 바람직하다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 한세놀라 폴리모르파 DL1-L의 경우 25℃에서 배양하였을 때 효소 활성이 높은 리파제를 생산하였고, 한세놀라 폴리모르파 A16의 경우 25℃에서, 사카로마이세스 세레비시에 Y2805의 경우 20℃에서 배양한 경우 가장 높은 효소 활성을 나타내고, 높은 생산량을 나타내는 리파제를 생산하였다(도 6 참조).

<80> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<81> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<82> <실시예 1> CALB를 발현하는 벡터 및 형질전환체의 제조

<83> 본 발명자들은 CALB를 한세놀라 폴리모르파(*H. polymorpha*)의 표면에 발현시키거나 또는 세포 외로 분비시키는 벡터를 제조하였다.

<84> 구체적으로, CALB를 세포 외로 분비시키는 벡터를 제조하기 위해 캔디다 엔타크티카의 유전체로부터 서열번호 1 및 서열번호 2로 기재되는 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응을 통하여 CALB 유전자를 획득하였다. CALB 합성을 위한 중합효소연쇄반응은 pfu 중합효소(스트라타진 사, 미국)를 이용하여, 94℃에서 3분동안 반응시키고, 94℃에서 1분간, 55℃에서 1분간, 72℃에서 1분간 반응을 15회 수행하고, 72℃에서 10분간 반응하는 조건으로 수행하고, 엡기서열 분석을 통하여 유전자를 확인하였다. 한세놀라 폴리모르파 발현벡터인 AMIpL1(Agaphonov *et al.*, *Yeast*, 1999, 15, 541)에 *GAPDH* 프로모터(Sohn *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 51, 800), 킬러독신 분비신호서열(killer toxin signal sequence)(Sor and Fukuhara., *Curr. Genet.*, 1985, 9, 147)이 삽입된 벡터의 평활화한 *KpnI* 및 *BamHI* 부위 내에, CALB 유전자를 *SapI*으로 절단하여 평활화한 후 *BamHI*을 이용하여 절단한 유전자를 삽입하여 도 1에서 보는 바와 같은 벡터를 제조한 후 "pGK-Lip*"로 명명하였다.

<85> 또한, 본 발명자들은 CALB를 표면에 발현하는 벡터를 제조하기 위해 캔디다 엔타크티카의 유전체로부터 서열번호 1 및 서열번호 3으로 기재되는 프라이머로 상기와 동일한 중합효소연쇄반응을 이용하여 획득한 CALB 유전자를 상기와 동일한 방법으로 절단하여 AMIpL1벡터에 삽입한 후 벡터 pGK LipF를 제조하였다. pGK LipF의 *BamHI*과 *HindIII* 절단 부위에 *CWP1* 유전자 유래의 표면 발현 매개체인 CwpF(PCT/KR00/00819)를 삽입하여 제조된 표면 발현 벡터는 "pGK-Lip-CwpF"라 명명하였다.

<86> 상기의 방법으로 제조한 CALB를 세포외로 분비하는 벡터(pGK-Lip*) 및 CALB를 표면에 발현하는 벡터(pGK-Lip-CwpF)를 한세놀라 폴리모르파 DL1-L 균주에 Li/TE 방법을 이용하여 형질

전환하여(Hill *et al.*, *Nucl. Acids. Res.*, 1991, 19, 5971) 최소 합성 배지(0.67% 아미노산이 결핍된 효모 기질 및 2% 포도당)에서 형질전환주를 선별하였다. 상기 방법으로 획득한 균주는 1% 트리뷰티린을 포함한 YPD 평판 배지(1% 효모 추출액, 2% 펩톤 및 2% 포도당)에 옮겨 균주 주변의 환의 크기를 측정하여 형질전환체의 활성을 확인하였다.

<87> 그 결과 균주 주변에 활성환이 나타나는 것을 확인함으로써 CALB가 발현함을 확인하였다.

<88> <실시예 2> 세포내 재조합(*In-vivo* recombination) 방법을 이용한 라이브러리(library) 구축

<89> 본 발명자들은 CALB의 변이주 라이브러리를 구축하기 위하여 사카로마이세스 세레비시애(*S. cerevisiae*)에서 보고된 바 있는 세포내 재조합 방법(Abecassis *et al.*, *Nucleic. Acids. Res.*, 2000, 28, E88)을 한세놀라 폴리모르파에 응용하여 CALB 라이브러리를 구축하였다.

<90> 세포내 재조합이란, 벡터의 양말단 부위와 상동성을 가지도록 합성된 삽입 절편 부분을 벡터와 함께 형질전환하여 세포 내에서 재조합에 의해 완전한 벡터가 만들어지도록 하는 방법이다. 세포내 재조합 방법을 이용할 경우, 대장균에서 미리 라이브러리를 제조할 필요가 없어 간단하고 효율적이며, 대장균에 유독한 유전자의 라이브러리를 구축하고자 할 경우에 용이하게 사용이 가능하다.

<91> CALB를 표면에 발현하는 벡터인 pGK-Lip-CwpF를 *EcoRI/PstI*으로 절단하여 얻어진 약 5 kb 절편을 겔을 통하여 회수한 후 형질전환을 위한 벡터로 사용하였다. 벡터 절편과 *HARS36* 부위 100 bp가 교차하도록 제작된

서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머를 이용하고 pGK-Lip-CwpF를 주형으로 사용하여 PCR 프리믹스 키트(바이오니아 사, 한국)를 이용한 중합효소연쇄반응으로 94℃에서 3분간 반응시키고, 94℃에서 30초간, 55℃에서 30초간, 72℃에서 1분간 반응을 25회 수행하고 72℃에서 7분간 반응시키는 조건으로 수행하여 획득한 삽입 절편 100 ng을 벡터 100 ng과 함께 한세 놀라 폴리모르파 균주에 Li/TE 방법을 이용하여 형질전환하였다.

<92> 그 결과 획득한 형질전환 균주를 무작위로 선별하여 1% 트리뷰티린을 포함한 YPD 평판 배지상에서 리파제 활성을 측정함으로써 균일한 활성을 지닌 라이브러리가 제조됨을 확인할 수 있었다.

<93> <실시예 3> CALB의 변이주 라이브러리 구축

<94> 본 발명자들은 CALB의 변이주 라이브러리를 구축하기 위하여, 변이유도 중합효소연쇄반응(error-prone PCR) 방법과 세포내 재조합 방법을 이용하였다.

<95> CALB를 표면에 발현하는 벡터인 pGK-Lip-CwpF를 주형으로 하여 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머를 사용하여 변이유도 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 변이유도는 PCR 랜덤 변이유도 키트(클론택 사, 미국)를 이용하여 1 kb 당 2 내지 5개의 변이를 유도하도록 하였으며 얻어진 DNA 절편은 겔에서 해당 크기의 절편을 절단하여 회수한 후 PCR 프리믹스 키트(바이오니아 사, 한국)를 이용하여 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머로 94℃에서 3분간 반응시키고, 94℃에서 30초간, 55℃에서 30초간, 72℃에서 1분간 반응을 25회 수행하고 72℃에서 7분간 반응시키는 조건으로 수행하였다.

- <96> 상기의 방법으로 얻어진 삽입 절편과 pGK-Lip-CwpF를 *EcoRI/PstI*으로 절단하여 얻어진 약 5 kb 절편인 벡터를 각각 100 ng씩 혼합하여 한세놀라 폴리모르파 균주에 Li/TE 방법을 이용하여 형질전환하였다.
- <97> 그 결과 약 1×10^4 개의 형질전환 균주를 획득하였다.
- <98> <실시에 4> CALB의 변이주 선별
- <99> 본 발명자들은 상기 실시예 3의 과정으로 제조된 CALB 변이주 라이브러리에서 높은 리파제 활성을 가지는 CALB 변이주를 선별하고자 하였다.
- <100> 상기 실시예 3에서 획득한 변이주 라이브러리 중 약 7,000개의 균주를 각각 1% 트리뷰틴을 포함한 YPD 평판 배지에 접종하여 24 시간 배양 후 큰 활성환을 보이는 균주 23 주를 1차 선별하였다. 평판 배지에서 1차 선별된 균주는 YPD 액체 배지에 접종하여 37℃에서 16 시간 배양한 후 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 세포 분획과 배양 상등액을 분리하였다. 상기 세포 분획은 50 mM pH 7.5의 트리스 완충액에 현탁하여 세척한 후 동량의 동일 완충액으로 현탁하였다.
- <101> 리파제의 활성을 측정하기 위하여 p-나이트로페닐 팔미테이트(p-nitrophenyl palmitate)(이하 'pNPP'라 약칭함)를 기질로 사용하였는데, 10 μ l 10mM pNPP, 40 μ l 에틸 알콜, 950 μ l 50 mM pH 7.5 의 트리스 완충액이 조합된 반응액에 100 μ l의 세포현탁액을 첨가한 후 25 °C에서 2 시간 반응한 후 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 상기 pNPP를 기질로 사용한 리파제 활성 측정 방법은 pNP기와 팔미테이트가 연결된 pNPP가 리파제에 의해 팔미테이

가. pNP기가 절단되어 나오면서 유리된 pNP기가 405 nm에서 흡광하는 정도를 측정하는 방법이다. (2) 발명에서 리파제의 활성 1 unit는 1 분당 1 μ M의 pNP기를 유리시키는 효소의 활성이다.

가. 전세포 분석에서 높은 활성을 나타내는 균주 Lip14, Lip10 및 Lip23을 최종 선

<103> <실시예 5> CALB 변이주의 분석

<104> 본 발명자들은 상기 실시예 4에서 최종적으로 획득된 3종의 변이주로부터 변이 유전자를 분석하였다.

<105> CALB 변이 유전자를 회수하기 위하여 변이주의 유전체를 분리한 후 이를 주형으로 하여 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머로 PCR 프리믹스 키트(바이오니아 사, 한국)를 이용하여 94℃에서 3분간 반응시키고, 94℃에서 30초간, 55℃에서 30초간, 72℃에서 1분간 반응을 25회 수행하고 72℃에서 7분간 반응시키는 조건으로 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 상기 획득한 DNA 절편은 젤로부터 회수하여 염기 서열 분석을 실시하였다.

<106> 그 결과 Lip10 및 Lip14의 염기 서열은 각각 서열번호 6 및 서열번호 7이고, 그로부터 유추된 아미노산의 서열은 각각 서열번호 9 및 서열번호 10이었다. 아미노산 서열에서 Lip10 및 Lip14의 경우 278 번째 루이신이 프롤린으로 치환된 변이가 확인되었으며, Lip14의 경우에는 추가적으로 219 번째 루이신이 글루타민으로 치환된 변이도 보유하고 있었다(도 2).

<107> 278번 루이신의 경우 CALB의 10 번째 α 헬릭스에 존재하는데 이 부위는 리파제 활성 부위의 뚜껑 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다(Uppenberg *et al.*, *structure.*, 1994, 2, 293). 10번째 α 헬릭스에는 다수의 소수성 아미노산이 포함되어 있고 루이신도 이들 중 하나인데 이 아미노산이 프롤린으로 치환된 경우 아미노산의 헬릭스 구조를 보다 안정화하고 다른 방향으로의 꺾임 구조를 생성할 수 있으며, 이로 인하여 활성부위의 노출 정도를 변화시켜 활성이 증가한 것으로 추정된다. 또한 278번 루이신은 활성 부위의 표면에 존재하는 전하를 띤 아미노산인 아스파라긴산 223번과 글루탐산 188번과 인접한 위치에 존재하는데 이 아미노산이 프롤린으로 변화한 경우 소수성 말단이 차지하는 공간이 줄어들어서 전하를 띤 아미노산인 아스파라긴산 223번과 글루탐산 188번이 위치하는 공간이 더 넓어지게 될 수 있어 활성 부위의 변화를 가져올 수 있다. 또한 넓어진 공간에 물 분자가 끼어들 수 있는 구조가 형성되는데 이 물 분자에 의해 기질이 보다 안정적으로 활성 부위에 존재할 수 있어 활성의 증가를 가져올 수 있을 것이다(도 3). 219번 루이신의 경우 표면으로 노출되어 있는 아미노산으로 소수성을 가지는데 이 아미노산이 친수성인 글루타민으로 변화하였다. CALB는 표면이 거의 소수성 아미노산으로 이루어진 효소로서 단백질의 표면에 이러한 친수성 아미노산이 위치함으로써 형태의 변화를 가져올 수도 있을 것이며, 물에서의 안정성을 보다 증가시킬 수도 있을 것이다. Lip23의 경우 CALB 유전자 말단 부위에 종말 코돈을 보유하고 있어 분비형 리파제를 생산함으로써 리파제 활성이 증대된 것으로 확인되었다.

<108> <실시예 6> CALB 변이주의 활성 측정

- <109> 본 발명자들은 상기 실시예 4에서 선별한 CALB 변이주를 이용해 리파제의 효소 활성을 측정하였다.
- <110> 유전자를 세포 표면에 발현하게 하기 위한 벡터를 제조하기 위해 변이주 및 야생형 CALB 발현균주의 유전체를 분리한 후 이를 주형으로 하여 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머로 PCR 프리믹스 키트(바이오니아 사, 한국)를 이용하여 94℃에서 3분간 반응시키고, 94℃에서 30초간, 55℃에서 30초간, 72℃에서 1분간 반응을 25회 수행하고 72℃에서 7분간 반응시키는 조건으로 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 상기 획득한 DNA 절편은 *EcoRI/ClaI*으로 절단한 후 단일 카피 삽입벡터(single copy integration vector)인 AMIpLD1 벡터(Agaphonov *et al.*, *Yeast.*, 1999, 15, 541)에 *GAPDH* 프로모터와 함께 삽입하여 유전자를 표면에 발현하는 벡터를 제조하고 이를 'pLGK-Lip10-CwpF' 및 'pLGK-Lip14-CwpF'라 명칭하였다.
- <111> 또한 유전자를 세포 외로 분비하도록 발현하는 벡터를 제조하기 위해 변이주 및 야생형 균주의 유전체를 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머로 PCR 프리믹스 키트(바이오니아 사, 한국)를 이용하여 94℃에서 3분간 반응시키고, 94℃에서 30초간, 55℃에서 30초간, 72℃에서 1분간 반응을 25회 수행하고 72℃에서 7분간 반응시키는 조건으로 중합효소연쇄반응을 수행하여 DNA 절편을 획득하였다. 상기의 DNA 절편을 AMIpLD1 벡터의 *EcoRI/BamHI* 위치에 *GAPDH* 프로모터와 함께 삽입하여 pLGK-Lip10* 및 pLGK-Lip14* 벡터를 제조하였다.
- <112> 상기의 각각의 벡터는 염기서열 분석을 통하여 야생형 및 변이형 CALB가 삽입된 것을 확인한 후 한세놀라 폴리모르파 DL1-L 균주에 Li/TE 방법을 이용하여 형질전환하고 서던 블롯(Southern blot) 분석을 통하여 유전체의 *LEU2*의 위치로 단일 카피로 삽입되었음을 확인하였다. 획득한 형질전환 균주를 각각 1% 트리뷰티린을 포함한 평판 배지에 접종한 후 37℃에서 24시간 배양하여 활성환을 관찰하여 활성의 증가를 확인하였다(도 4). 형질전환 균주는 다시

YPD 액체 배지에서 16 시간 배양한 후 원심분리를 통하여 배양 상등액 분획과 전세포 분획을 분리하여 pNPP를 기질로 사용하여 활성을 측정하였다.

<113> 그 결과 리파제 활성은 표면 발현 균주의 전세포 활성은 두 가지의 변이주 모두 약 5배 증가하였으며, 분비형으로 발현하였을 경우 배양 상등액의 활성은 Lip10의 경우 야생형에 비하여 약 5배, Lip14의 경우 야생형에 비하여 약 10배 증가하였음을 확인하였다(표 1).

<114> 【표 1】

야생형 CALB와 변이 CALB의 한세놀라 폴리모르파에서의 활성 비교
배양 상등액 활성(U/ℓ)

Lip*	15,255
Lip10*	86,535
Lip14*	164,700
전세포 활성 (U/ℓ)	
Lip CwpF	174
Lip10 CwpF	831
Lip14 CwpF	765

<115> 또한, CALB를 분비하는 균주의 배양상등액을 12%의 SDS-PAGE로 분석하여 실버 염색 (silver-staining)으로 확인하였다(도 5). Lip10을 발현하는 균주는 야생형 CALB를 발현하는 균주와 동일한 양의 CALB 밴드를 보이는 데 반하여 Lip14를 보유한 균주는 다른 균주에 비해 많은 양의 CALB 단백질 밴드를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 분비형 Lip14가 Lip10에 비하여 2 배 이상 높은 리파제 활성을 보이는 것은 단백질의 분비량이 많기 때문이었다. 또한 표면 발현형에서 이들 균주가 활성의 차이를 보이지 않는 것으로 볼 때, 외래 단백질을

표면 발현할 경우 항상 일정량의 단백질만이 표면으로 이동하여 분비량 및 생산량의 차이를 극복한 것으로 보인다.

<116> <실시에 7> 변이주로부터의 CALB의 정제 및 특성 분석

<117> 본 발명자들은 변이 CALB의 특성을 보다 정확히 분석하기 위하여 야생형 CALB 및 변이 CALB를 분리 정제하였다.

<118> 분비형 CALB를 포함한 각각의 균주를 YPD 배지에서 18 시간 배양한 후 5,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 배양 상등액을 회수하고 울트라필트레이션(Ultrafiltration)을 통하여 10배 농축한 후 단백질 용액에 암모늄 설페이트(Ammonium sulfate)를 1 M의 농도가 되도록 첨가하였다. 상기 방법으로 회수된 용액을 1 M 암모늄 설페이트가 포함된 50 mM, pH 6.5의 포스페이트 완충액으로 포화되어있는 부틸 세파로즈 CL-4B 컬럼(파마시아 사, 미국)으로 통과시킨 후 100% 물을 이용하여 농도를 낮추어가면서 단백질을 용출하였다. 상기 용출된 단백질 분획 중 리파제 활성을 나타내는 분획을 회수한 후 다시 울트라필트레이션을 이용하여 농축하고 슈퍼텍스-G200 젤 여과 컬럼 크로마토그래피(파마시아 사, 미국)를 이용해 정제하여 Lip10, LIP14 및 야생형 리파제(Lip wt)의 정제된 각각의 단백질을 획득하였다.

<119> 정제된 단백질을 이용하여 pNPP를 기질로 사용할 경우의 K_m 과 K_{cat} 을 측정함으로써 변이 단백질과 야생형 단백질을 비교 분석하였다. pNPP를 농도별로 첨가한 리파제 반응액을 제조한 후 각각 10 μ l의 단백질 용액을 첨가하여 시간당 pNP기의 유리에 의한 405 nm에서의 흡광도의 증가치를 이용하여 최초 속도값(V_i)을 측정하였다.

<120> 최초 속도값을 이용하여 미켈리스-멘텐 방정식을 적용하여 얻어진 각 단백질의 K_m 값을 계산한 결과, Lip10과 Lip14의 경우 모두 거의 증가되지 않았다. 각 단백질의 K_{cat} 값은 각각 6.3배, 8배 증가하여 Lip10과 Lip14이 기질 친화도의 큰 변화 없이 활성이 증가했다(표 2). 또한, 각 단백질을 50℃에서 10 분간 방치한 후 잔존 활성을 측정하여 단백질의 열 안정성을 실험한 결과 변이 단백질과 야생형 단백질간의 열 안정성에 큰 차이가 없었다. 또한 (R,S)-아세틸 이스터(Acetyl ester)를 기질로 하여 광학선별성(stereoselectivity)을 측정한 결과, 야생형과 변이 단백질간의 차이를 보이지 않아 광학 선별성에도 큰 차이가 없는 것으로 확인되었다.

<121> 따라서 각 변이 단백질은 안정성의 변화 없이 효소의 활성이 5 배 이상 증가했다.

<122> 【표 2】

각 변이주의 CALB 활성

	$K_m(\mu\text{mol})$	V_{max}	$K_{cat}(S^{-1}\mu\text{mol}^{-1})$
Lip wt	20.3	119	78
Lip10	19.8	749	494.7
Lip14	30.4	956	630.9

<123> <실시예 8> 부분변이 도입(site-directed mutagenesis)을 이용한 변이 특성 분석

<124> 본 발명자들은 변이 단백질의 특성 변화가 직접적으로 아미노산의 변화에 의한 것인지 확인하기 위해 부분변이 도입을 이용해 변이 특성을 분석하였다.

<125> Lip10과 Lip14에 공통으로 존재하는 L278P(278번 루이신이 프롤린으로 치환)변이와, Lip14에 단독으로 존재하는 L219Q(219번 루이신이 글루타민으로 치환)변이를 야생 유전자에 부분 변이도입을 위한 효소연쇄 중합반응을 통하여 제조한 후 그 영향을 분석하였다. 부분 변이

서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18로 기재되는 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 중합효소연쇄반응은 CALB 야생형 유전자를 주형으로 중합효소를 이용하여, 94℃에서 3분간 반응시키고, 94℃에서 1분간, 55℃에서 1분 1분간 반응을 15회 수행하고, 72℃에서 10분간 반응하는 조건으로 수행하였다.

L219Q 변이 유전자를 합성하기 위해서 야생형 유전자를 주형으로 서열번호 2 및 서열번호 4로 기재되는 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응을 수행하여 유전자를 합성하고, 서열번호 15로 기재되는 프라이머를 이용하여 유전자를 합성한 후 상기 두 개의 유전자 절편을 혼합한 후 이 혼합액을 주형으로 하여 서열번호 2 및 서열번호 4로 기재되는 프라이머로 중합효소연쇄반응을 하여 상기 두 절편을 연결하였다. 상기의 중합효소연쇄반응의 조건은 각 유전자 절편 각 5 μ l, 프라이머 각 3 μ l를 첨가하고 ExTaq 중합효소(다카라 사, 일본)를 이용하여 94℃에서 3분간 반응시키고, 94℃에서 30초간, 55℃에서 30초간, 72℃에서 90초간 반응을 20회 수행하고, 72℃에서 7분간 반응하는 조건으로 하였다. 상기 방법으로 합성된 유전자는 *EcoRI/ClaI*으로 절단하여 pLGK-Lip-CwpF 벡터의 동일 부위에 삽입하고 'pLGK-LP'로 명명하였다.

<127> L219Q 변이를 도입한 서열번호 8로 기재되는 유전자를 합성하기 위해서는 야생형 유전자를 주형으로 서열번호 2 및 서열번호 15로 기재되는 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응으로 유전자를 합성하고, 서열번호 4 및 서열번호 16으로 기재되는 프라이머를 이용하여 유전자를 합성한 후, 상기 각 유전자 절편을 혼합한 후 이 혼합액을 주형으로 하여 서열번호 2 및 서열번호 4로 기재되는 프라이머로 상기와 동일한 조건의 중합효소연쇄반응을 하여 두 절편을 연결하였다. 상기의 방법으로 합성된 유전자는 *EcoRI/ClaI*으로 절단하여 pLGK-Lip-CwpF 벡터의 동일 부위에 삽입하고 'pLGK-LQ'로 명명하였다.

<128> L278P와 L219Q 변이를 모두 도입한 유전자를 획득하기 위해서는 pLGK-LP유전자를 주형으로 하여 서열번호 2 및 서열번호 15 그리고 서열번호 4 및 서열번호 16으로 기재되는 프라이머를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 유전자를 합성한 후 상기와 동일한 방법으로 'pLGK-LPQ'를 제조하였다. 각각의 벡터는 한세놀라 폴리모르파 균주에 Li/TE 방법을 이용하여 형질전환하였다. 상기 획득한 형질전환 균주는 YPD 배지에서 18시간 배양한 후 배양 상등액을 회수하여, 상기와 동일한 방법으로 리파제 활성을 측정하였다.

<129> 그 결과, LP 및 LPQ의 경우, Lip10 및 Lip14와 동일한 활성의 증가를 나타내었다(표 3). 또한 서열번호 11로 기재된 아미노산으로 구성된 LQ의 경우에도 야생형 유전자에 비하여 약 3배 더 높은 리파제 활성을 보였는데, LQ의 활성 증가를 분석하기 위하여 각각의 균주의 배양 상등액을 SDS-PAGE을 통하여 비교해 본 결과, LQ의 경우 LPQ와 동일한 단백질 생산량을 보였다(도 5).

<130> 【표 3】

부분 변이 도입 CALB의 활성비교

리파제	상등액 활성 (U/ℓ)
Lip wt	17,458
Lip10	118,401
Lip14	190,854
LP	98,890
LQ	48,850
LPQ	200,300

<131> 따라서 L219Q 변이가 주로 단백질의 생산량을 증가시키며, L278P 변이는 단백질의 비활성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Kcat의 값으로 미루어 볼 때 Lip14는 Lip10에

비하여 단백질의 양적 증가 이외의 활성 증가 효과를 보여 L219Q 변이가 복합적인 역할을 할 수 있는 것으로 보인다.

<132> <실시예 9> 배양온도에 따른 CALB의 발현 변화

<133> 본 발명자들은 CALB의 최적 배양 조건을 확립하기 위해 배양온도를 달리하여 CALB의 활성을 측정하였다.

<134> pLGK-Lip14*를 포함한 한세놀라 폴리모르파 DL1-L균주를 다양한 온도에서 배양하여 활성을 측정하였다. 균주는 YPD 배지에 초기 흡광도(600 nm)가 1 이 되도록 접종한 후 20℃, 25℃, 30℃ 또는 37℃에서 배양하면서 배양 상등액을 회수하여 활성을 측정하였다. 활성 측정은 pNPP를 기질로 사용하고, 50mM pNPP 25 μ l, 에틸 알콜 450 μ l, 50 mM 트리스 완충액(pH 7.5) 9500 μ l가 조합된 반응액 200 μ l에 적절하게 희석된 10 μ l의 세포배양 상등액을 첨가한 후 25℃에서 반응하면서 405 nm에서의 V_i 를 측정하였다. 리파제의 활성 1 AU(임의 단위, arbitrary unit)는 위의 조건에서의 V_i 값으로 정의하였다.

<135> 그 결과 각 온도에서의 리파제 활성 및 생육은 25℃에서 가장 높은 활성을 보였고, 37℃에서 생육할 경우 오히려 시간이 지남에 따라 급속한 활성의 저하를 보이는 것을 확인할 수 있었다(도 6a).

<136> 이는 세포가 사멸기에 들어가면서 세포에서 분비되어 나온 단백질 분해효소(protease)에 의한 영향으로, 이와 같은 현상이 상대적으로 적은 것으로 알려진 한세놀라 폴리모르파

A16(CBS4732의 유도체) 균주를 이용하여 동일한 실험을 반복하였다. 한세놀라 폴리모르파 A16 균주에 pLGK-Lip14* 플라스미드를 상기와 동일한 방법으로 형질전환한 후 얻어진 형질전환 균주를 YPD 배지에 초기 흡광도(600 nm)가 1 이 되도록 접종한 후 25℃, 30℃ 및 37℃에서 배양하면서 배양 상등액을 회수하여 활성을 측정하였다.

<137> 그 결과 한세놀라 폴리모르파 DL1-L 균주에 비해 한세놀라 폴리모르파 A16 균주에서는 리파제의 활성 감소가 거의 없었으며 저온에서 배양할수록 더 많은 리파제를 발현하는 것을 확인할 수 있었다(도 6b). 따라서, 25℃에서 30 시간 배양할 경우 480 AU의 효소를 생산할 수 있어 가장 높은 활성의 리파제를 회수할 수 있었다.

<138> <실시예 10> 사카로마이세스 세레비시애에서의 CALB의 발현

<139> 효소의 최적 생산을 위하여 사카로마이세스 세레비시애에 변이 CALB를 발현하였다.

<140> Lip14변 유전자는 서열번호 2 및 서열번호 12의 프라이머를 이용하여 효소연쇄 중합 반응으로 합성한 후 YEG α HIR525백터(Choi *et al.*, *Appl. Microbial. biotechnol.*, 1994, 42, 587)의 *EcoRI/BamHI* 부위에 서열번호 13으로 기재되는 α-아밀라제 분비신호서열과 *NdeI*으로 융합하여 연결하였다. 상기의 방법에 의해 제조된 백터를 사카로마이세스 세레비시애 Y2805(MAT α pep4::HIS3 prb-Δ1.6R can1 his3-20 ura3-52) 균주에 Li/TE 방법을 이용하여 형질전환하였으며, 형질전환 균주는 SC-URA(0.67% 아미노산이 결핍된 효모 기질, 2% 포도당 및 우라실을 제외한 각종 아미노산) 배지를 이용하여 선별하였다. 상기 선별된 균주는 1% 트리뷰

티린이 포함된 YPDG(1% 효모 추출액, 2% 펩톤, 0.5% 포도당 및 1.5% 갈락토오스) 배지에서 배양하면서 리파제 활성을 측정하였다.

141> 그 결과 배지상에서 활성환을 확인할 수 있었으며, 확인된 균주는 YPDG 액체 배지에 접종하여 30℃에서 24 시간 발현한 후 활성을 측정하였다.

142> 또한 한세놀라 폴리모르파와 동일한 온도 효과가 있는지의 확인을 위하여 각각 20℃와 30℃에서 배양하면서 배양 상등액을 회수한 후 활성을 비교 분석하였다.

143> 그 결과 20℃에서 발현할 경우 720 AU로 30℃에서 발현한 경우에 비하여 10 배 이상 높은 활성을 나타내었다.

【발명의 효과】

144> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 변이 리파제를 스크리닝하는 방법은 높은 활성의 변이 리파제를 생산하는 형질전환체를 용이하게 제조할 수 있으며, 상기 형질전환체에서 제조된 변이 리파제는 형질전환된 세포의 표면에 고정화되고, 재생산이 가능할 뿐만 아니라 대량 생산이 가능하므로, 식품 산업, 미세 화합물 합성 및 계면 활성제 사업 등에 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

- 1) 리파제의 유전자를 표면 발현 벡터에 클로닝하는 단계;
- 2) 상기 단계 1의 발현 벡터의 리파제 유전자를 주형으로 변이 유도 PCR을 수행하여 변이 리파제 유전자를 제조하는 단계;
- 3) 상기 단계 2를 통해 증폭된 변이 유전자를 표면 발현 벡터와 함께 숙주세포에 형질전환시키는 단계; 및
- 4) 상기 단계 3의 형질전환체 표면에 발현된 변이 리파제의 활성을 측정하여 활성이 뛰어난 변이 리파제를 스크리닝하는 단계를 포함하는 변이 리파제 스크리닝 방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 단계 1의 리파제 유전자는 서열번호 14로 기재되는 캔디다 엔타크티카 리파제 B인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 표면 발현 벡터는 프로모터 유전자, 분비신호서열을 코딩하는 유전자, 리파제 유전자 또는 변이 리파제 유전자, 표면 발현 매개 유전자 및 터미네이터 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

BEST AVAILABLE COPY

제 3항에 있어서, 상기 프로모터 유전자는 GAPDH, PGK, ADH, PHO5, GAL1, GAL10, SED1,

TPI로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

항에 있어서, 상기 분비신호서열을 코딩하는 유전자는 MF α , PHO5, SUC2, AMY, SED

신호신으로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 6】

제 3항에 있어서, 상기 표면 발현 매개 유전자는 SED1, PIR2, TIP1, CWP1, GAS1 및 WSC1로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 7】

제 1항에 있어서, 단계 2의 변이 리파제 유전자는 캔디다 엔타크티카 리파제 B의 219번 루이신 및/또는 278번 루이신이 다른 아미노산으로 치환된 변이 단백질을 코딩하는 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 8】

제 1항에 있어서, 단계 3의 숙주세포는 캔디다, 디베리오마이세스, 한세놀라, 클루이베로마이세스, 피키아, 스킨조사카로마이세스, 야로이아 및 사카로마이세스 속 등의 효모류, 아

스퍼질러스, 페니실리움 및 라이조퍼스 속 등의 사상 균류 및 에서리키아 및 바실러스 속 등의 세균류로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 상기 숙주세포는 캔디다, 디베리오마이세스, 한세놀라, 클루이베로마이세스, 피키아, 스킴조사카로마이세스, 야로이야 및 사카로마이세스 속 으로 구성된 군으로부터 선택되는 효모류인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 10】

제 1항의 방법에 의해 선별된 서열번호 14로 기재되는 캔디다 엔타크티카 리파제 B의 219번 루이신 및/또는 278번 루이신이 다른 아미노산으로 치환된 것을 특징으로 하는 변이 리파제 단백질.

【청구항 11】

제 10항에 있어서, 상기 단백질은 219번 루이신이 글루타민, 히스티딘, 아르기닌, 리신, 세린, 트레오닌, 아스파라긴산 및 글루탐산으로 구성된 군으로부터 선택되는 친수성 아미노산으로 치환된 것을 특징으로 하는 변이 리파제 단백질.

【청구항 12】

제 11항에 있어서, 상기 219번 루이신이 글루타민으로 치환된 서열번호 11로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 변이 리파제 단백질.

【청구항 13】

제 10항에 있어서, 상기 단백질은 278번 루이신이 프롤린, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산으로 치환된 것을 특징으로 하는 변이 리파제 단백질.

【청구항 14】

제 13항에 있어서, 상기 278번 루이신이 프롤린으로 치환된 서열번호 9로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 변이 리파제 단백질.

【청구항 15】

제 10항에 있어서, 상기 단백질은 219번 루이신이 글루타민으로 치환되고, 278번 루이신 아미노산이 프롤린으로 치환된 서열번호 10으로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 변이 리파제 단백질.

【청구항 16】

제 10항의 변이 리파제 단백질을 코딩하는 유전자.

【청구항 17】

제 16항에 있어서, 상기 유전자는 제 11항의 변이 리파제 단백질을 코딩하는 서열번호 8로 기재되는 것을 특징으로 하는 유전자.

【청구항 18】

제 16항에 있어서, 상기 유전자는 제 13항의 변이 리파제 단백질을 코딩하는 서열번호 6으로 기재되는 것을 특징으로 하는 유전자.

【청구항 19】

제 16항에 있어서, 상기 유전자는 제 15항의 변이 리파제 단백질을 코딩하는 서열번호 7로 기재되는 것을 특징으로 하는 유전자.

【청구항 20】

제 16항의 유전자를 포함하는 발현 벡터.

【청구항 21】

제 20항에 있어서, 상기 발현 벡터는 프로모터 유전자, 분비신호서열 유전자, 제 17항의 유전자, 터미네이터 유전자 및/또는 표면 발현 매개 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 22】

제 20항에 있어서, 상기 발현 벡터는 프로모터 유전자, 분비신호서열 유전자, 제 18항의 유전자, 터미네이터 유전자 및/또는 표면 발현 매개 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 23】

제 20항에 있어서, 상기 발현 벡터는 프로모터 유전자, 분비신호서열 유전자, 제 19항의 유전자, 터미네이터 유전자 및/또는 표면 발현 매개 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 24】

제 21항 내지 제 23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터 유전자는 GAPDH, PGK, ADH, PHO5, GAL1, GAL10, SED1, MOX, TEF 및 TPI로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 25】

제 21항 내지 제 23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분비신호서열을 코딩하는 유전자는 MF α , PHO5, SUC2, AMY, SED 및 킬러톡신으로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 26】

제 21항 내지 제 23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표면 발현 매개 유전자는 SED1, PIR2, TIP1, CWP1, GAS1 및 WSC1로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 27】

제 20항의 발현 벡터를 숙주세포에 도입시킨 형질전환체.

【청구항 28】

제 27항에 있어서, 상기 형질전환체는 제 22항의 발현 벡터를 숙주세포에 도입시킨 것을 특징으로 하는 형질전환체(수탁번호: KCTC 10320BP).

BEST AVAILABLE COPY

제 30항에 있어서, 상기 형질전환체는 숙주세포에 제 23항의 발현 벡터를 숙주세포에 도
특징으로 하는 형질전환체(수탁번호: KCTC 10321BP).

상의 형질전환체를 배양하여 제 10항의 변이 리파제 단백질을 생산하는 방법.

【청구항 31】

제 30항에 있어서, 상기 형질전환체를 형질전환 숙주세포의 배양 적온에 비하여 20℃ 내
적 5℃에서 저온에서 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 32】

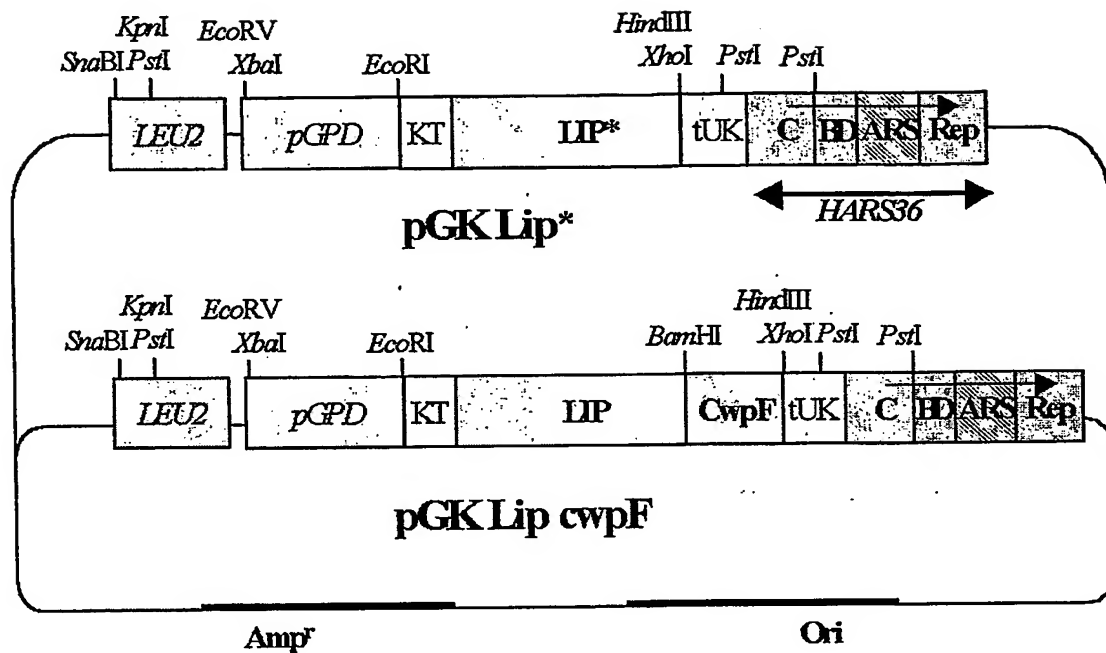
제 31항에 있어서, 상기 형질전환체가 한세놀라인 경우 25℃ 내지 30℃에서 배양하는 것
을 특징으로 하는 방법.

【청구항 33】

제 31항에 있어서, 상기 형질전환체가 사카로마이세스인 경우 20℃ 내지 25℃에서 배양
하는 것을 특징으로 하는 방법.

【도면】

【도 1】



【도 2】

	*	20	*	40	*	
LIP10.PRO :	MNIFYIFLFLLSFVQGTATPLVKRLPSGSDPAFSQPKSVLDAGLTCQGAS :	50				
LIP14.PRO :	MNIFYIFLFLLSFVQGTATPLVKRLPSGSDPAFSQPKSVLDAGLTCQGAS :	50				
WTLIP.PRO :	MNIFYIFLFLLSFVQGTATPLVKRLPSGSDPAFSQPKSVLDAGLTCQGAS :	50				

	60	*	80	*	100	
LIP10.PRO :	PSSVSKPILLVPGTGTTGPQSFDSNWIPLSAQLGYTPCWISPPPFMLNDT :	100				
LIP14.PRO :	PSSVSKPILLVPGTGTTGPQSFDSNWIPLSAQLGYTPCWISPPPFMLNDT :	100				
WTLIP.PRO :	PSSVSKPILLVPGTGTTGPQSFDSNWIPLSAQLGYTPCWISPPPFMLNDT :	100				

	*	120	*	140	*	
LIP10.PRO :	QVNTTEYMVNAITTLTYAGSGNNKLPVLTWSQGGLVAQWGLTFFPSIRSKVD :	150				
LIP14.PRO :	QVNTTEYMVNAITTLTYAGSGNNKLPVLTWSQGGLVAQWGLTFFPSIRSKVD :	150				
WTLIP.PRO :	QVNTTEYMVNAITTLTYAGSGNNKLPVLTWSQGGLVAQWGLTFFPSIRSKVD :	150				

	160	*	180	*	200	
LIP10.PRO :	RLMAFAPDYKGTVLAGPLDALAVSAPSVWQOTTGSALTTALRNAGGLTQI :	200				
LIP14.PRO :	RLMAFAPDYKGTVLAGPLDALAVSAPSVWQOTTGSALTTALRNAGGLTQI :	200				
WTLIP.PRO :	RLMAFAPDYKGTVLAGPLDALAVSAPSVWQOTTGSALTTALRNAGGLTQI :	200				

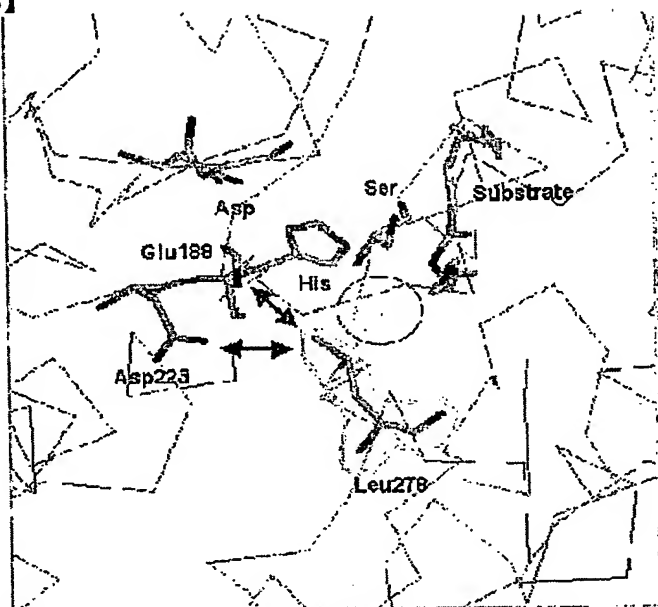
	*	220	*	240	*	
LIP10.PRO :	VPTTNLYSATDEIVQPQVSNSPLDSSYLENGKNVQAQAVCGPLFVIDHAG :	250				
LIP14.PRO :	VPTTNLYSATDEIVQPQVSNSPLDSSYLENGKNVQAQAVCGPLFVIDHAG :	250				
WTLIP.PRO :	VPTTNLYSATDEIVQPQVSNSPLDSSYLENGKNVQAQAVCGPLFVIDHAG :	250				

	260	*	280	*	300	
LIP10.PRO :	SLTSQFSYVVGRSALRSTTGQARSADYGITDCNPLPANDLTPEQKVAAAA :	300				
LIP14.PRO :	SLTSQFSYVVGRSALRSTTGQARSADYGITDCNPLPANDLTPEQKVAAAA :	300				
WTLIP.PRO :	SLTSQFSYVVGRSALRSTTGQARSADYGITDCNPLPANDLTPEQKVAAAA :	300				

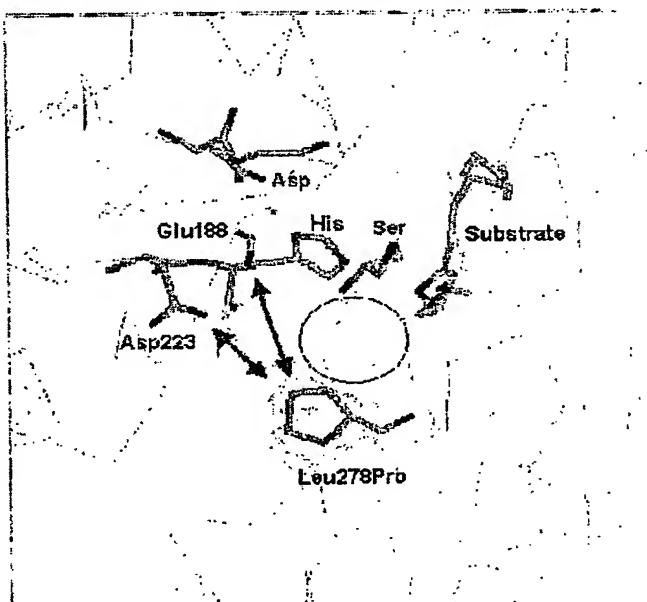
	*	320	*	340	
LIP10.PRO :	LEAPAAAAIVAGPKQNCPEDLMPYARPEAVGKRTC SGIVTPGS :	343			
LIP14.PRO :	LEAPAAAAIVAGPKQNCPEDLMPYARPEAVGKRTC SGIVTPGS :	343			
WTLIP.PRO :	LEAPAAAAIVAGPKQNCPEDLMPYARPEAVGKRTC SGIVTPGS :	343			

【도 3】

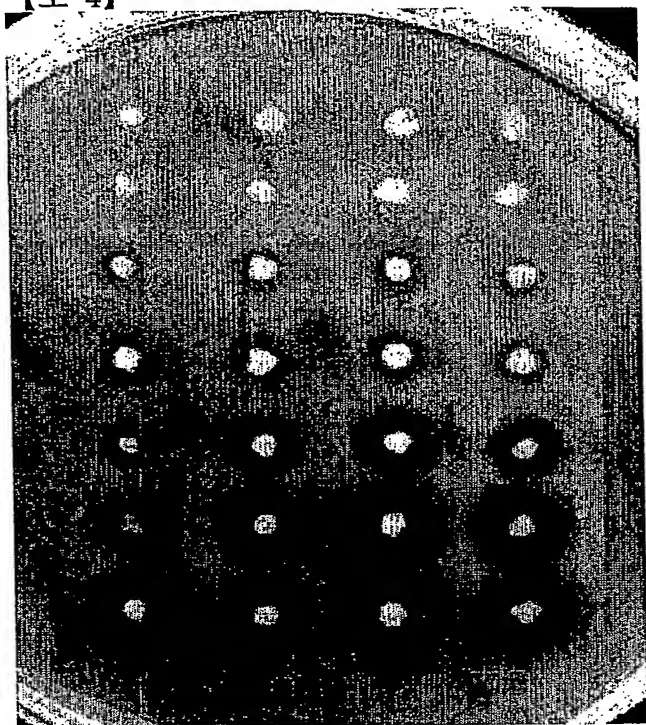
A



B



【도 4】

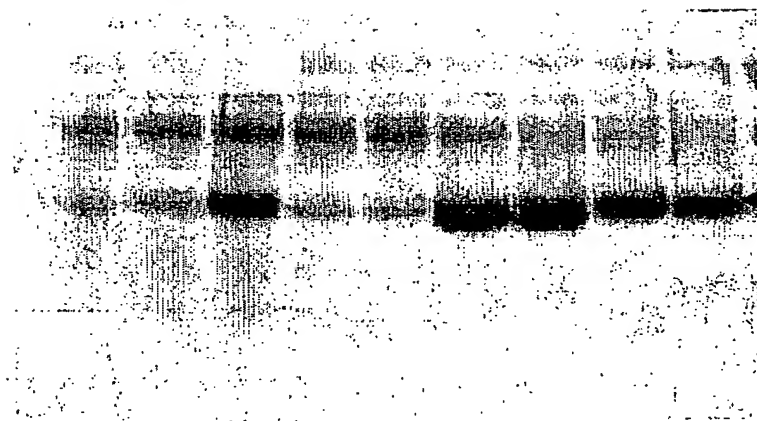


1
2
3
4
5
6
7

BEST AVAILABLE COPY

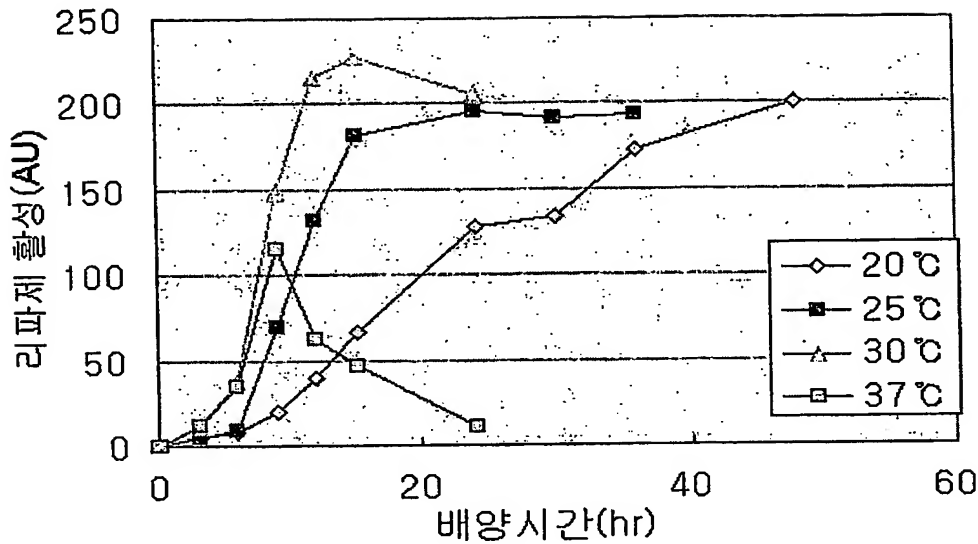
【도 5】

1 2 3 4 5 6 7 8 9

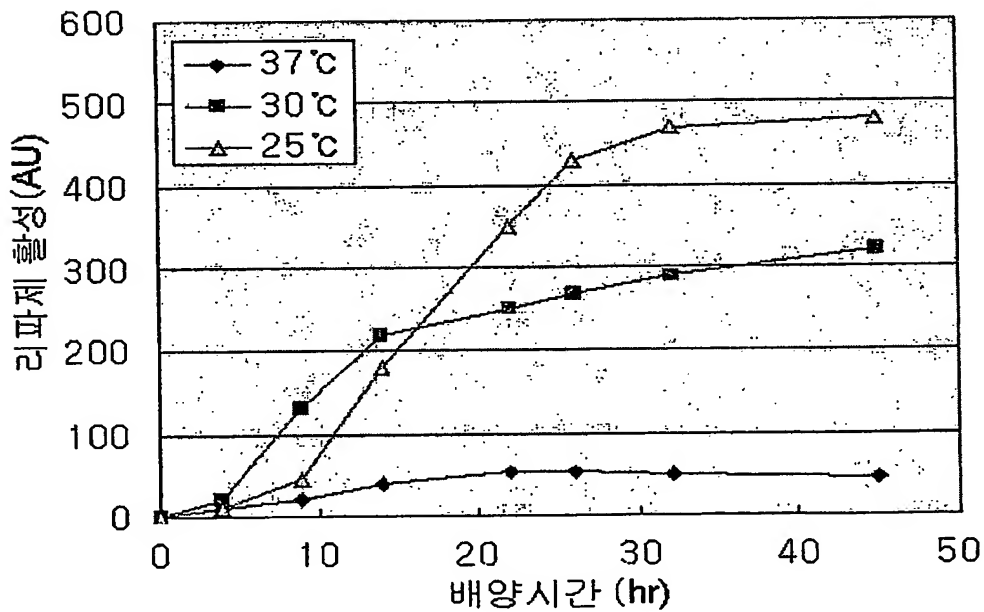


CALB

【도 6a】



【도 6b】



【서열목록】

<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology <120> Method for the screening of lipase having improved enzymatic activity using yeast surface display vector and its product <130> 2p-06-79 <160> 18 <170>

In 1.71 <210> 1 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <22
 > <213> CALB primer 1 <400> 1 ggctcttcag ccactccttt ggtgaag
 2 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 mer 2 <400> 2 gcggatcctc agggggtgac gat
 3 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 mer 3 <400> 3 gcggatccgg ggggtgacgat gccggag
 4 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 GPD-err primer <400> 4 gcagagctaa ccaataagg
 19 <210> 5 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 T-0 primer <400> 5 tgcagttgaa cacaaccac
 19 <210> 6 <211> 1023 <212> DNA <213> Candida antarctica <220> <221>
 sig_peptide <222> (-51)..(-1) <223> secretion signal <400> 6 atgaatat
 ttacatatt ttgtttttg ctgtcattcg ttcaaggtag cgcactccc 9 ttggtgaagc
 gtctgccttc cggttcggac cctgcctttt cgcagcccaa gtcggtgctc 69 gatgcgggtc
 tgacctgcca ggggtgcttcg ccatactcgg tctccaaacc catccttctc 129 gtccccggaa
 ccggcaccac aggtccacag tcgttcgact cgaactggat cccctctct 189 gcgcagctgg
 gttacacacc ctgctggatc tcacccccgc cgttcattgct caacgacacc 249 cagggtcaaca
 cggagtacat ggtcaacgcc atcaccacgc tctacgctgg ttcgggcaac 309 aacaagcttc
 ccgtgctcac ctgggtcccag ggtggtctgg ttgcacagtg gggcttgacc 369 ttcttcccca
 gtatcaggtc caaggtcgat cgacttatgg cctttgcgcc cgactacaag 429 ggccaccgtcc
 tcgccggccc tctcgatgca ctcgcgggta gtgcaccctc cgtatggcag 489 caaaccaccg

gttcggcact cactaccgca ctccgaaacg caggtgggtct gacccagatc	549 gtgcccacca
ccaacctcta ctcggcgacc gacgagatcg ttcagcctca ggtgtccaac	609 tcgccactcg
actcatccta cctcttcaac gggaagaacg tccaggcaca ggctgtgtgt	669 gggccgctgt
tcgtcatcga ccatgcaggc tcgctcacct cgcagttctc ctacgtcgtc	729 ggtcgatccg
ccctgcgtc caccacgggc caggctcgta gtgcagacta tggcattacc	789 gactgcaacc
ctttcccgcc caatgatctg actcccgagc aaaaggctgc cgcggctgcg	849 ctcccggcgc
cggcggctgc agccatcgtg gcgggtccaa agcagaactg cgagcccgac	909 ctcatgccct
acgcccggcc ctttgcagta ggcaaaagga cctgctccgg catcgtcacc	969 ccc
972 <210> 7 <211> 1023 <212> DNA <213> Candida antarctica <220> <221>	
sig_peptide <222> (-51)..(-1) <223> secretion signal <400> 7 atgaatatat	
tttacatatt tttgtttttg ctgtcattcg ttcaaggtac cgccactcct	9 ttggtgaagc
gtctgccttc cggttcggac cctgcctttt cgcagcccaa gtcggtgctc	69 gatgcgggtc
tgacctgcca aggtgcttcg ccatactcgg tctccaaacc catccttctc	129 gtccccggaa
cggcaccac aggtccacag tcgttcgact cgaactggat cccctctct	189 gcgcagctgg
gttacacacc ctgctggatc tcacccccgc cgttcatgct caacgacacc	249 caggtcaaca
cggagtacat ggtcaacgcc atcaccacgc tctacgttgg ttcgggcaac	309 aacaagcttc
ccgtgtcac ctgggtccag ggtgggtctgg ttgcacagtg gggcttgacc	369 ttcttcccca
gtatcaggtc caaggtcgat cgacttatgg cctttgcgcc cgactacaag	429 ggcaccgtcc
tcgccggccc tctcgatgca ctgcgggtta gtgcaccctc cgtatggcag	489 caaaccaccg
gttcggcact cactaccgca ctccgaaacg caggtgggtct gacccagatc	549 gtgcccacca
ccaacctcta ctcggcgacc gacgagatcg ttcagcctca ggtgtccaac	609 tcgccactcg

actcacccta ccttttcaac ggaaagaacg tccaggcaca ggctgtgtgt	669 gggccgcagt
tcgtcatcga ccatgcaggc tcgtcacct cgcagttctc ctacgtcgtc	729 ggtcgatccg
ccctgcgctc caccacgggc caggctcgta gtgcggacta tggcattacg	789 gactgcaacc
ctcttccgc caatgatctg actcccgagc aaaaggctgc cgcggctgcg	849 ctcccggcgc
cggcggctgc agccatcgtg gcgggtccaa agcagaactg cgagcccgcg	909 ctcatgcctt
acgcccgcct ctttgcagta ggcaaaagga cctgctccgg catcgtcacc	969 ccc
972 <210> 8 <211> 1023 <212> DNA <213> Candida antarctica <220> <221>	
sig_peptide <222> (-51)..(-1) <223> secretion signal <400> 8 atgaatat	
tttaccatatt tttgtttttg ctgtcattcg ttcaaggtac cgccactcct	9 ttggtgaagc
gtctgccttc cggttcggac cctgcctttt cgcagcccaa gtcggtgctc	69 gatgcgggtc
tgacctgcca gggtgcttcg ccactctcgg tctccaaacc catccttctc	129 gtccccggaa
ccggcaccac aggtccacag tcgttcgact cgaactggat cccctctct	189 gcgcagctgg
gttacacacc ctgctggatc tcacccccgc cgttcattgt caacgacacc	249 caggtcaaca
cggagtacat ggtcaacgcc atcaccacgc tctacgttgg ttcgggcaac	309 aacaagcttc
ccgtgctcac ctggtcccag ggtggtctgg ttgcacagtg gggcttgacc	369 ttcttcccca
gtatcaggtc caaggctgat cgacttatgg cctttgcgcc cgactacaag	429 ggcaccgtcc
tcgccggccc tctcgatgca ctgcgggtta gtgcaccctc cgtatggcag	489 caaaccaccg
gttcggcact cactaccgca ctccgaaacg cagggtgtct gaccagatc	549 gtgcccacca
ccaacctcta ctggcgacc gacgagatcg ttcagcctca ggtgtccaac	609 tcgccactcg
actcacccta cctcttcaac ggaaagaacg tccaggcaca ggctgtgtgt	669 gggccgcagt
tcgtcatcga ccatgcaggc tcgtcacct cgcagttctc ctacgtcgtc	729 ggtcgatccg

```

ccctgcgctc caccacgggc caggctcgta gtgcagacta tggcattacg      789 gactgcaacc
ctcttcccg ccaatgatctg actcccgagc aaaaggctgc cgcggctgcg      849 ctctggcg
cggcggctgc agccatcgtg gcgggtccaa agcagaactg cgagcccgac      909 ctcatgccct
acgcccggcc cttigcagta ggcaaaagga cctgctccgg catcgtcacc      969 ccc

972 <210>    9 <211>    341 <212>    PRT <213>    Candida antarctica <220> <221>
SIGNAL <222>    (-24)..(-8) <223>    secretion signal <400>    9 Met Asn Ile Phe Tyr
Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Phe Val Gln Gly -24                -20                -15
-10 Thr Ala Thr Pro Leu Val Lys Arg Leu Pro Ser Gly Ser Asp Pro Ala                -5
1                6 Phe Ser Gln Pro Lys Ser Val Leu Asp Ala Gly Leu Thr Cys Gln Gl
11                16                21 Ala Ser Pro Ser Ser Val Ser Lys Pro Ile
Leu Leu Val Pro Gly Thr                26                31                36 Gly Thr Thr
Gly Pro Gln Ser Phe Asp Ser Asn Trp Ile Pro Leu Ser 41                46
51                56 Ala Gln Leu Gly Tyr Thr Pro Cys Trp Ile Ser Pro Pro Pro Phe
Met                61                66                71 Leu Asn Asp Thr Gln
Val Asn Thr Glu Tyr Met Val Asn Ala Ile Thr                76                81
86 Thr Leu Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Asn Lys Leu Pro Val Leu Thr Trp                91
96                101 Ser Gln Gly Gly Leu Val Ala Gln Trp Gly Leu Thr Phe Phe Pro
Ser 106                111                116 Ile Arg Ser Lys Val Asp Arg Leu
Met Ala Phe Ala Pro Asp Tyr Lys 121                126                131
136 Gly Thr Val Leu Ala Gly Pro Leu Asp Ala Leu Ala Val Ser Ala Pro
141                146                151 Ser Val Trp Gln Gln Thr Thr Gly Ser Ala

```

Leu Thr Thr Ala Leu Arg 156 161 166 Asn
 Ala Gly Gly Leu Thr Gln Ile Val Pro Thr Thr Asn Leu Tyr Ser 171
 176 181 Ala Thr Asp Glu Ile Val Gln Pro Gln Val Ser Asn Ser Pro Leu
 Asp 186 191 196 Ser Ser Tyr Leu Phe Asn Gly Lys
 Asn Val Gln Ala Gln Ala Val Cys 201 206 211
 216 Gly Pro Leu Phe Val Ile Asp His Ala Gly Ser Leu Thr Ser Gln Phe
 221 226 231 Ser Tyr Val Val Gly Arg Ser Ala Leu Arg
 Ser Thr Thr Gly Gln Ala 236 241 246 Arg
 Ser Ala Asp Tyr Gly Ile Thr Asp Cys Asn Pro Leu Pro Ala Asn 251
 256 261 Asp Leu Thr Pro Glu Gln Lys Val Ala Ala Ala Ala Leu Pro Ala
 Pro 266 271 276 Ala Ala Ala Ala Ile Val Ala Gly
 Pro Lys Gln Asn Cys Glu Pro Asp 281 286 291
 296 Leu Met Pro Tyr Ala Arg Pro Phe Ala Val Gly Lys Arg Thr Cys Ser
 301 306 311 Gly Ile Val Thr Pro 316
 <210> 10 <211> 341 <212> PRT <213> Candida antarctica <220> <221>
 SIGNAL <222> (-24)..(-8) <223> secretion signal <400> 10 Met Asn Ile Phe Ty
 Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Phe Val Gln Gly -24 -20 -15
 -10 Thr Ala Thr Pro Leu Val Lys Arg Leu Pro Ser Gly Ser Asp Pro Ala -5
 1 6 Phe Ser Gln Pro Lys Ser Val Leu Asp Ala Gly Leu Thr Cys Gln Gl
 11 16 21 Ala Ser Pro Ser Ser Val Ser Lys Pro Ile
 Leu Leu Val Pro Gly Thr 26 31 36 Gly Thr Thr

Gly Pro Gln Ser Phe Asp Ser Asn Trp Ile Pro Leu Ser 41 46
 51 56 Ala Gln Leu Gly Tyr Thr Pro Cys Trp Ile Ser Pro Pro Pro Phe
 Met 61 66 71 Leu Asn Asp Thr Gln
 Val Asn Thr Glu Tyr Met Val Asn Ala Ile Thr 76 81
 86 Thr Leu Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Asn Lys Leu Pro Val Leu Thr Trp 91
 96 101 Ser Gln Gly Gly Leu Val Ala Gln Trp Gly Leu Thr Phe Phe Pro
 Ser 106 111 116 Ile Arg Ser Lys Val Asp Arg Leu
 Met Ala Phe Ala Pro Asp Tyr Lys 121 126 131
 136 Gly Thr Val Leu Ala Gly Pro Leu Asp Ala Leu Ala Val Ser Ala Pro
 141 146 151 Ser Val Trp Gln Gln Thr Thr Gly Ser Ala
 Leu Thr Thr Ala Leu Arg 156 161 166 Asn
 Ala Gly Gly Leu Thr Gln Ile Val Pro Thr Thr Asn Leu Tyr Ser 171
 176 181 Ala Thr Asp Glu Ile Val Gln Pro Gln Val Ser Asn Ser Pro Leu
 Asp 186 191 196 Ser Ser Tyr Leu Phe Asn Gly Lys
 Asn Val Gln Ala Gln Ala Val Cys 201 206 211
 216 Gly Pro Gln Phe Val Ile Asp His Ala Gly Ser Leu Thr Ser Gln Phe
 221 226 231 Ser Tyr Val Val Gly Arg Ser Ala Leu Arg
 Ser Thr Thr Gly Gln Ala 236 241 246 Arg
 Ser Ala Asp Tyr Gly Ile Thr Asp Cys Asn Pro Leu Pro Ala Asn 251
 256 261 Asp Leu Thr Pro Glu Gln Lys Val Ala Ala Ala Ala Leu Pro Ala
 Pro 266 271 276 Ala Ala Ala Ala Ile Val Ala Gly

BEST AVAILABLE COPY

Pro Gln Asn Cys Glu Pro Asp 281

291

291 Leu Met Pro Tyr Ala Arg Pro Phe Ala Val Gly Lys Arg Thr Cys Ser

306

311 Gly Ile Val Thr Pro

316

11 <211> 341 <212> PRT <213> Candida antarctica <220> <221>

-222> (-24)..(-1) <223> secretion signal <400> 11 Met Asn Ile Phe Ty

Leu Phe Leu Leu Ser Phe Val Gln Gly -24

-20

-15

Thr Ala Thr Pro Leu Val Lys Arg Leu Pro Ser Gly Ser Asp Pro Ala

-5

1 6 Phe Ser Gln Pro Lys Ser Val Leu Asp Ala Gly Leu Thr Cys Gln Gl

11

16

21 Ala Ser Pro Ser Ser Val Ser Lys Pro Ile

Leu Leu Val Pro Gly Thr

26

31

36 Gly Thr Thr

Gly Pro Gln Ser Phe Asp Ser Asn Trp Ile Pro Leu Ser 41

46

51

56 Ala Gln Leu Gly Tyr Thr Pro Cys Trp Ile Ser Pro Pro Phe

Met

61

66

71 Leu Asn Asp Thr Gln

Val Asn Thr Glu Tyr Met Val Asn Ala Ile Thr

76

81

86 Thr Leu Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Asn Lys Leu Pro Val Leu Thr Trp

91

96

101 Ser Gln Gly Gly Leu Val Ala Gln Trp Gly Leu Thr Phe Phe Pro

Ser 106

111

116 Ile Arg Ser Lys Val Asp Arg Leu

Met Ala Phe Ala Pro Asp Tyr Lys 121

126

131

136 Gly Thr Val Leu Ala Gly Pro Leu Asp Ala Leu Ala Val Ser Ala Pro

141

146

151 Ser Val Trp Gln Gln Thr Thr Gly Ser Ala

Leu Thr Thr Ala Leu Arg

156

161

166 Asn

Ala Gly Gly Leu Thr Gln Ile Val Pro Thr Thr Asn Leu Tyr Ser 171

176 181 Ala Thr Asp Glu Ile Val Gln Pro Gln Val Ser Asn Ser Pro Leu

Asp 186 191 196 Ser Ser Tyr Leu Phe Asn Gly Lys

Asn Val Gln Ala Gln Ala Val Cys 201 206 211

216 Gly Pro Gln Phe Val Ile Asp His Ala Gly Ser Leu Thr Ser Gln Phe

221 226 231 Ser Tyr Val Val Gly Arg Ser Ala Leu Arg

Ser Thr Thr Gly Gln Ala 236 241 246 Arg

Ser Ala Asp Tyr Gly Ile Thr Asp Cys Asn Pro Leu Pro Ala Asn 251

256 261 Asp Leu Thr Pro Glu Gln Lys Val Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala

Pro 266 271 276 Ala Ala Ala Ala Ile Val Ala Gly

Pro Lys Gln Asn Cys Glu Pro Asp 281 286 291

296 Leu Met Pro Tyr Ala Arg Pro Phe Ala Val Gly Lys Arg Thr Cys Ser

301 306 311 Gly Ile Val Thr Pro 316

<210> 12 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

CALB primer 4 <400> 12 ctcatatgct accttccggt tcggac

26 <210> 13 <211> 21 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>

a-amylase secretion signal <400> 13 Met Met Val Ala Trp Trp Ser Leu Phe Leu Tyr

Gly Leu Gln Val Ala 1 5 10 15 Ala

Pro Ala Leu Ala 20 <210> 14 <211> 317 <212> PRT <213>

Candida antarctica <400> 14 Leu Pro Ser Gly Ser Asp Pro Ala Phe Ser Gln Pro Lys

Ser Val Leu 1 5 10 15 Asp Ala Gly

Leu Thr Cys Gln Gly Ala Ser Pro Ser Ser Val Ser Lys 20
 25 30 Pro Ile Leu Leu Val Pro Gly Thr Gly Thr Thr Gly Pro Gln Ser
 Phe 35 40 45 Asp Ser Asn Trp Ile Pro Leu
 Ser Ala Gln Leu Gly Tyr Thr Pro Cys 50 55 60
 Trp Ile Ser Pro Pro Pro Phe Met Leu Asn Asp Thr Gln Val Asn Thr 65
 70 75 80 Glu Tyr Met Val Asn Ala Ile Thr Thr Leu
 Tyr Ala Gly Ser Gly Asn 85 90 95
 Asn Lys Leu Pro Val Leu Thr Trp Ser Gln Gly Gly Leu Val Ala Gln 100
 105 110 Trp Gly Leu Thr Phe Phe Pro Ser Ile Arg Ser Lys Val Asp Arg
 Leu 115 120 125 Met Ala Phe Ala Pro Asp Tyr
 Lys Gly Thr Val Leu Ala Gly Pro Leu 130 135 140
 Asp Ala Leu Ala Val Ser Ala Pro Ser Val Trp Gln Gln Thr Thr Gly 145
 150 155 160 Ser Ala Leu Thr Thr Ala Leu Arg Asn Ala
 Gly Gly Leu Thr Gln Ile 165 170 175
 Val Pro Thr Thr Asn Leu Tyr Ser Ala Thr Asp Glu Ile Val Gln Pro 180
 185 190 Gln Val Ser Asn Ser Pro Leu Asp Ser Ser Tyr Leu Phe Asn Gly
 Lys 195 200 205 Asn Val Gln Ala Gln Ala Val
 Cys Gly Pro Leu Phe Val Ile Asp His 210 215 220
 Ala Gly Ser Leu Thr Ser Gln Phe Ser Tyr Val Val Gly Arg Ser Ala 225
 230 235 240 Leu Arg Ser Thr Thr Gly Gln Ala Arg Ser
 Ala Asp Tyr Gly Ile Thr 245 250 255

Asp Cys Asn Pro Leu Pro Ala Asn Asp Leu Thr Pro Glu Gln Lys Val 260
 265 270 Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ile Val Ala
 Gly 275 280 285 Pro Lys Gln Asn Cys Glu Pro
 Asp Leu Met Pro Tyr Ala Arg Pro Phe 290 295 300
 Ala Val Gly Lys Arg Thr Cys Ser Gly Ile Val Thr Pro 305 310
 315 <210> 15 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
 <223> LQ53 primer <400> 15 gctgtgtgtg ggccgcagtt cgtcatcg
 28 <210> 16 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 LQ35 primer <400> 16 gcatggtcga tgacgaactg cggcccacac
 30 <210> 17 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 LP53 primer <400> 17 gtcgccgcgg ctgcgctccc ggcgccggcg
 30 <210> 18 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 LP35 primer <400> 18 ctgcagccgc cggcgccggg agcgagcc
 29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/KR03/01820
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**IPC7 C12Q 1/68**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 : C12Q 1/68, C12N 9/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Patents and application for inventions since 1975Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE, NPS, PAJ, CA on line, STN on line**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J. MOL. CATALYSIS. B: ENZYMATIC, vol. 3, pp. 51-54 (1997) see the whole document	1-26
Y	NUCLEIC ACIDS RES., vol. 28, no. 16, E78 (2000) see the whole document	1, 3-6, 8, 9
Y	STRUCTURE, vol. 2, no. 4, pp. 293-308 (1994) see the whole document	2, 7, 10-26
A	WO 9514783 A (SHOWA DENKO K.K.) 01 JUN 1995 see the whole document	1-26
A	CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPID, vol. 93, pp. 95-101 (1998) see the whole document	1-26

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 DECEMBER 2003 (30.12.2003)

Date of mailing of the international search report

30 DECEMBER 2003 (30.12.2003)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-3541

Authorized officer

BAIK, Kyong UP

Telephone No. 82-42-481-5596



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR03/01820

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
9514783 A	01.06.95	JP 7143883 A	06.06.95

BEST AVAILABLE COPY